

**PCT**

**NOTIFICATION OF ELECTION**

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 07 December 1999 (07.12.99)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/02477	<b>Applicant's or agent's file reference</b> PCT98
<b>International filing date</b> (day/month/year) 13 May 1999 (13.05.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 14 May 1998 (14.05.98)
<b>Applicant</b> UENO, Yoshiyuki	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
05 November 1999 (05.11.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p align="center">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer  Antonia Muller</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 45/00, 39/395, 38/02, 31/70, C07K 16/18, C12N 15/09</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/58150</p> <p>(43) 国際公開日 1999年11月18日(18.11.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02477</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月13日(13.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/131771 1998年5月14日(14.05.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 上野義之(UENO, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒980-0812 宮城県仙台市青葉区片平1-2-35-206 Miyagi, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101-0032 東京都千代田区岩本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: PREVENTIVES/REMEDIES FOR HEPATIC CIRRHOSIS</p> <p>(54)発明の名称 肝硬変予防・治療剤</p> <p>(57) Abstract Novel preventives/remedies for hepatic cirrhosis or bile duct disappearance syndrome which contain as the active ingredient a Fas antagonist; and a preventive/therapeutic method.</p>		

(57)要約

F a s アンタゴニストを有効成分とする新規な肝硬変または胆管消失症候群の  
予防・治療剤および予防・治療方法の提供。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LJ リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スウジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノールウェー	YC ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジーランド	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

## 明 細 書

肝硬変予防・治療剤

## 5 技術分野

本発明はF a s アンタゴニストを有効成分として含有することを特徴とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤に関する。

## 背景技術

- 10 F a s は、ヒト線維芽細胞でマウスを免疫して得られたモノクローナル抗体であるF a s 抗体（Y o n e h a r a S. 等、J. E x p. M e d. , 169巻、1747-1756頁、1989年）によって認識され、アポトーシスのシグナルを細胞に伝達する細胞表面抗原である。I t o h N. 等によって、F a s 遺伝子がクローニングされ、F a s が約45 kDの細胞膜上の蛋白質であり、そのアミノ酸配列からTNFレセプターファミリーに属することが
- 15 判明した（C e l l , 66巻、233-243頁、1991年）。また、マウスF a s 遺伝子もクローニングされ、F a s mRNAが、マウスの胸腺、肝、肺、心臓、卵巣で発現していることが確認された（W a t a n a b e - F u k u n a g a 等、J. I m m u n o l. , 148巻、1274-1279頁、
- 20 1992年）。

ヒトF a s リガンドは、F a s を発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する生体内分子として、N a g a t a 等により報告されたポリペプチドである

(Takahashi T. 等、International Immunology、6巻、1567-1574頁、1994年)。ヒトFasリガンドは、TNFファミリーに属する分子量約40 kDのII型糖蛋白質で、TNFと同様に、生体内で3量体を形成すると考えられている(Tanaka M. 等、EMBO Journal、14巻、1129-1135頁、1995年)。また、ヒトFasリガンドはラットFasリガンド(Suda T. 等、Cell、75巻、1169-1178頁、1993年)やマウスFasリガンド(Takahashi T. 等、Cell、76巻、969-976頁、1994年)と細胞外領域において高いホモロジーを有しており、ヒトFasリガンドは

10 ヒトFasのみでなくマウスFasをも認識し、アポトーシスを誘導することができる。逆に、ラットFasリガンド及びマウスFasリガンドも、ヒトFasを認識してアポトーシスを誘導することができる。

また、Fasを介するアポトーシスの細胞内シグナル伝達機序に関しても研究が進んでおり、Fasの細胞内領域、特にデスドメイン(Death

15 domain)と呼ばれる領域と相互作用してシグナルを伝達または抑制する因子の同定及びクローニングが報告されている他、インターロイキン-1変換酵素(ICE)関連チオールプロテアーゼがFasを介するアポトーシスのシグナル伝達に寄与している可能性が示唆されている。

---

近年、アポトーシス、特にFasを介するアポトーシスと種々の疾患及び生理

20 現象との関連が示唆されている。たとえば、ウイルス性劇症肝炎における肝細胞死及びある種の自己免疫疾患等において、Fasを介するアポトーシスの異常が関与する可能性が示唆されている。

また、Fas/Fasリガンド系はアポトーシス以外の機能、たとえば、好中球に作用して起炎症性に働く作用等も担っている可能性が示唆されている（Kayagaki N. 等、臨床免疫 28巻、667-675頁、1996年）。

- 5 肝硬変は慢性進行性肝疾患の末期的症状であり、広範な線維化と再生結節を伴う肝小葉構造の改築を来した病変であり、肝炎とは区別される。線維増生、結節形成による門脈の圧迫、類洞の狭小化などにより血流の減少、肝細胞への酸素、基質供給不全が起こり、これにより肝細胞機能不全が起こり、また肝細胞壊死が惹起されるという悪循環が繰り返される。さらにこのような肝臓の形態的変化が
- 10 門脈圧亢進を来し、食道静脈瘤、腹水などの合併症をもたらす。成因はウイルス性、薬物性、アルコール障害性、寄生虫性、うっ血性、胆汁性及びその他（Wilson病等）に分けられる（Kamata, T.、日本内科学会雑誌 80巻、1561-1562頁、1991年、Harada, T.、日本内科学会雑誌 80巻、1563-1567頁、1991年、Okudaira, M.、日本内科学会雑誌 80巻、1568-1571頁、1991年）。

- 肝硬変の成因に対する治療は困難なことが多く、安静及び食事療法により肝細胞の代謝及び再生を促進し、肝障害の進展を少しでも抑制することが治療の中心となっている。近年、肝蛋白質合成促進薬、線維化抑制薬等が検討されているが、未だ不十分である（消化器疾患最新の治療 '95 - '96、
- 20 Niwa H. 等監修、肝硬変、Murawaki Y. 等著、302-307頁、1997年）。

胆管消失症候群は肝内胆管が広汎に消失し、胆汁うっ滞が遷延する病態で

ある。広汎な肝内胆管消失後には種々の2次的な病変が管内に発生する。これらの胆管消失の多くは不可逆性である。周囲に種々の程度の線維化及び好中球を含む炎症性細胞の浸潤がみられ、この他に肝細胞の腫大及び淡明化、肝細胞内への銅顆粒の沈着、並びにマロリ体の出現等の慢性の胆汁うっ滞像がみられる。最終的にははめ絵状の再生結節が出現し、胆汁性肝硬変へと移行する。一部の肝内胆管が再生する例では、管腔に乏しく不規則な分枝を示す細胆管の高度な増生がみられ、胆汁うっ滞が改善する。これは肝細胞が化生した結果と考えられている。胆肝消失が肝内に限局した場合、その領域の肝萎縮及び線維化がみられるが、細胆管反応及び胆汁うっ滞像は通常みられない（N a k a n u m a Y.、肝胆膵、26巻、363-370頁、1993年）。

胆汁性肝硬変は遷延する胆汁うっ滞に続いて起こる病変であり、肝臓は硬く緑色調の強い顆粒状ないし結節状を示す疾患である。門脈域の幅広い線維化が進展して隣接門脈域間で結合し肝小葉を輪状に囲み、線維束は小葉中心帯と連なることもある。胆石症や慢性胆管炎などの胆道系疾患による胆道狭窄や不完全閉塞で見られる続発性と原発性がある。

原発性胆汁性肝硬変は代表的な自己免疫性肝疾患であり、肝外胆管に閉塞要因が存在しないにもかかわらず、長期にわたって胆汁うっ滞をきたし、末期には肝硬変の病像を呈する病因不明の難治性肝疾患である。自己免疫性疾患として特徴づけられるのは、抗糸粒体（antimitochondrial antibody, AMA）の存在であり、抗核抗体等が陽性である症例も一部にみられる。また自覚症状により無症候性（a-PBC）と症候性（s-PBC）に分類されている。病理学的には、一次的障害部位は直径40～80μmの中等大の小



葉間胆管ないしこれより太い隔壁胆管にあると考えられ、初期病変は慢性非化膿性破壊性胆管炎（CNSDC）が生じ本症に特徴的な組織所見である。これら胆管レベルでは上皮細胞の乳嘴状増殖、上皮細胞の変性・壊死、ときに脱落をきたす。また、その近傍には、胚中心をもつリンパ球集簇または胆管周囲に肉芽腫を認める場合があり、組織球様細胞、類上皮細胞を伴い、サルコイドーシス類似の形態を示すこともある。形態的变化はScheuer分類により、I期がCNSDCの所見の見られる時期（CNSDC期、florid duct lesion）、II期が細胆管増殖が著明で小葉間胆管の消失を認める時期（細胆管増生期、ductular proliferation）、III期が炎症反応が軽減し種々の濃度の線維化を認める時期（瘢痕期、scarring）で、IV期が硬変期（肝硬変期、cirrhosis）に分類されている（井上恭一等、医学のあゆみ別冊消化器疾患II. 肝・胆・膵、356－360頁、1993年、大西弘生等、月間薬事、32巻、151－157頁、1990年）。

現在、薬剤療法としては対症療法的にウルソデオキシコール酸（UDCA）が用いられているが、対症療法として継続投与が必要であり、完治には至らず、進行度合いにより改善が期待できない症例もある（今日の治療指針1997、Hinohara S. 等監修、原発性胆汁性肝硬変、Tanaka N. 著、408－409頁、1997年、Kajiya G. 等、治療78巻増刊号（標準処方ガイド 原発性硬化性胆管炎）、854－856頁、1996年）。

動物の肝細胞障害モデルにおいてFasが肝細胞の増殖性変性の調節に関与していること、各種ヒト肝疾患においてFasの発現が増強されており、この増強

にはインターフェロナー $\gamma$ 等のサイトカインが関与している可能性が高いこと、また同疾患においてFasリガンドの発現も増強されていること等が報告されている(Ryou K. 等、現代医療、29巻、165-169頁、1997年)。さらに同報告ではウイルス性肝炎ではFasシステムにより、アルコール性肝硬変では肝炎とは異なるアポトーシスの機序が推察されている。またFasを利用した肝疾患の診断・治療として、肝疾患群の血中可溶性Fasを測定することによる肝疾患の評価方法(特許出願公開公報特開平9-72901)及びヒトFasリガンド抗体を有効成分とする肝炎治療剤(特許出願公開公報特開平9-124509)が知られている。しかしながら、  
10 上記肝硬変の病態にFas/Fasリガンドを介したアポトーシスが、直接または間接的に関与しているかどうかは依然として不明であり、Fasアンタゴニストによる肝硬変の予防剤・治療剤は知られていない。

Harada, K. 等及びT. Kuroki等は小葉肝胆管等の組織学的検討において、アポトーシス細胞の散見及びFasの発現が正常肝よりも原発性胆汁性肝硬変症例の肝に多いと報告した(肝臓、38巻、suppl. 195頁、1996年、Virchows Arch, 429巻、119-129頁)。しかしながら、上記原発性胆汁性肝硬変の病態にFas/Fasリガンドを介したアポトーシスが、直接若しくは間接的に関与しているかどうかは  
15 依然として不明であり、Fasアンタゴニストによる原発性胆汁性肝硬変の予防  
20 剤・治療剤は知られていない。

発明の開示

本発明の課題は、F a s アンタゴニストという新規な作用機序による肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤を提供することである。より詳しくは、本発明はF a s アンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤及び予防・治療方法を提供する。

- 5      本発明者らは、肝硬変または胆管消失症候群患者を救うべく、F a s を介するアポトーシスと当該疾患の関連性を鋭意研究してきたが、肝硬変または胆管消失症候群モデルにおいてF a s アンタゴニスト等のアポトーシスを抑制する物質が病態を改善することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記の予防・治療剤に関するものである。

- 10      (1) F a s アンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤。

(2) 前記F a s アンタゴニストがF a s - F a s リガンドの結合抑制する物質である(1)に記載の予防・治療剤。

- (3) 前記F a s アンタゴニストがF a s 誘導体である(1)または(2)に  
15      記載の予防・治療剤。

(4) 前記F a s アンタゴニストが抗F a s リガンド抗体である(1)または(2)に記載の予防・治療剤。

(5) 前記肝硬変が胆汁性肝硬変である(1)～(4)のいずれかに記載の予防・治療剤。

- 20      (6) 前記肝硬変が原発性胆汁性肝硬変である(5)に記載の予防・治療剤。

(7) 前記胆管消失症候群が免疫学的機序による胆管消失症候群である請求項(1)～(4)のいずれかに記載の予防・治療剤。

(8) 前記 Fas アンタゴニストを投与する肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療方法。

(9) 前記肝硬変または胆管消失症候群の予防および／または治療のための医薬品を製造するための Fas アンタゴニストの使用。

5

発明を実施するための最良の形態

以下にさらに詳細に本発明を説明する。

本発明の予防・治療剤の対象となる肝硬変には種々の疾患が含まれる。成因別に分類すると、自己免疫性肝硬変、胆汁性肝硬変、ウイルス性肝硬変、アルコール障害性肝硬変、代謝異常症による肝硬変、うっ血による肝硬変、肝毒物質による肝硬変、寄生虫性肝硬変または栄養障害性肝硬変に大別される。好ましくは、自己免疫性肝硬変または胆汁性肝硬変が本発明の対象となる。また、本発明の予防・治療剤の対象となる胆管消失症候群には種々の疾患が含まれる。肝内胆管消失を成因別に分類すると、遺伝的要因、免疫学的要因、感染要因、血管障害

10 コール障害性肝硬変、代謝異常症による肝硬変、うっ血による肝硬変、肝毒物質による肝硬変、寄生虫性肝硬変または栄養障害性肝硬変に大別される。好ましくは、自己免疫性肝硬変または胆汁性肝硬変が本発明の対象となる。また、本発明の予防・治療剤の対象となる胆管消失症候群には種々の疾患が含まれる。肝内胆管消失を成因別に分類すると、遺伝的要因、免疫学的要因、感染要因、血管障害

15 または化学物質による胆管消失をきたす疾患それぞれが本発明の対象となる。なお、胆管消失症候群は同義語として「syndrome of disappearing intrahepatic bile ducts」、「ductopenia」、「vanishing bile duct syndrome (disease)」または「ductopenic rejection」

20 等の名称が使用されている。

自己免疫性肝硬変には原発性胆汁性肝硬変またはルポイド肝炎が含まれる。

胆汁性肝硬変には原発性胆汁性肝硬変または続発性胆汁性肝硬変が含まれる。

好ましくは、原発性胆汁性肝硬変が本発明の対象となる。

ウイルス性肝硬変にはB型肝炎ウイルス由来肝硬変、C型肝炎ウイルス由来肝硬変またはその他の肝炎ウイルス由来の肝硬変が含まれる。

代謝異常症による肝硬変にはヘモクロマトーシス由来肝硬変、ウィルソン病（Wilson病）由来肝硬変、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠損症由来肝硬変、ポルフィリン症由来肝硬変、糖原病由来肝硬変、IV型グリコーゲン合成由来肝硬変、ガラクトース血症由来肝硬変及び先天性チロジン血症由来肝硬変、C型肝炎ウイルス由来肝硬変またはその他の肝炎ウイルス由来の肝硬変が含まれる。

うっ血による肝硬変には肝静脈閉塞症由来肝硬変、バッド・キアリ症候群（Budd-Chiari症候群）由来肝硬変、長時間持続した収縮性心膜炎由来肝硬変またはうっ血性心不全由来肝硬変が含まれる。

肝毒物質による肝硬変にはあさり中毒由来肝硬変、黄変米由来肝硬変、アフラトキシン由来肝硬変、四塩化炭素由来肝硬変またはメソトレキセート抗生物質由来肝硬変が含まれる。

15 寄生虫性肝硬変には日本住血吸虫由来肝硬変、肝ジストマ由来肝硬変または肝蛭由来肝硬変が含まれる。

栄養障害性肝硬変にはクワシオルコル（kwashiorkor）由来肝硬変または腸吻合術由来肝硬変が含まれる。

20 遺伝的要因による胆管消失症候群には肝内胆管減少症または小葉間胆管減少症が含まれる。

免疫学的機序による胆管消失症候群には上述の原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎サルコイドーシス移植に伴う胆管消失症候群、特に肝移植に伴う胆管

消失症候群、が含まれる。

感染による胆管消失症候群には大腸菌等の腸内細菌上行感染による細菌性化膿性胆管炎、2次性硬化性胆管炎またはサイトメガロウィルス、レオウィルス、EBウィルス若しくは梅毒トリポネーマ等の感染による肝内胆管減少症が含まれる。

血管障害による胆管消失症候群には冠動脈または動脈血管網の血流障害による胆管虚血性壊死または胆肝障害が含まれる。

化学物質による胆管消失症候群にはサルファ剤、抗生物質、T i o p r o n i nまたはM e t h y l d o p a等を起因薬剤とする小葉胆管の変性、壊死または消失が含まれる。

これらの疾患において、F a sアンタゴニストが各疾患で起こっているF a sを介するアポトーシスを抑制し、疾患の予防・治療効果をもたらす。

なお、治療対象としてはヒトが重要であるが、ヒト以外の哺乳類も含みうる。

本発明の予防・治療剤はF a sアンタゴニストを有効成分とすることから分かるように、肝硬変または胆管消失症候群の重要な作用機序中におこるF a sを介するアポトーシスを抑制することによって肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療効果を達成するものと考えられる。しかし、病態中でおこるF a sを介するアポトーシスがどのような細胞のどの段階で起こり、それが最終的な病態にどの

ように影響しているかについてはほとんど分かっていない。また、肝硬変と肝炎とは前述のように病態として全く異なっている。前述の特許出願公開公報、特開平9-124509号記載の実施例のモデルでは、アポトーシスを誘引するF a sリガンドの供給源としてヒトの末梢血単核細胞及びs t a p h y l o c c

occalt enterotoxin Bを投与して、強制的にアポトーシスを引き起こさせ肝炎モデルを作成している。本発明の実施例の肝硬変または胆管消失性症候群のモデルでは直接的なアポトーシス誘因物質は投与しておらず、病態の一因がアポトーシスであるとしても、そのアポトーシスは内的に誘引されたものである。すなわち、両実施例におけるモデルは全く異なっており、そこで生じるアポトーシスも全く同じ作用機序によるものとは考えられない。これらのことから、特許出願公開公報、特開平9-124509号に記載のアポトーシスによる肝細胞の死に直接起因する肝炎と、前述の肝硬変または胆管消失症候群が全く同じアポトーシスによる疾患とは考えられない。また、特許出願公開公報、  
5  
10 特開平9-124509号に記載のアポトーシスによる肝細胞の死に直接起因する肝炎の治療効果と、本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療効果が同様のアポトーシス抑制作用によるものとは考えられない。

本発明で使用されるFasアンタゴニストとは、Fasを介するアポトーシスを抑制または阻害するものであれば特に限定されない。

15 具体的にはFas-Fasリガンドの結合を抑制する物質がある。これらは、Fasによるシグナルの発生または伝達をいずれかの段階で遮断し、Fas/Fasリガンド系の機能または生物作用、特にFasを介するアポトーシスを抑制するものであれば特に限定されず、Fasリガンド若しくはFasの作用、機能若しくは発現を抑制するもの、Fasリガンド細胞外領域若しくはFas細胞外領域と相互作用するもの、FasリガンドとFasの相互作用を抑制するもの、Fas細胞内領域とそれと相互作用する細胞内因子との相互作用に影響するもの、またはFasを介するアポトーシスのシグナル伝達に関す  
20

る細胞内因子（例えばICE様プロテアーゼ）の活性を抑制するもの等のさまざまな作用機序を有するものが含まれる。また、タンパク質性の高分子物質または低分子の化合物のいずれもが含まれる。

より具体的には、Fasを介するアポトーシスを抑制する活性を有する、

- 5 Fas誘導体、抗Fas抗体、抗Fasリガンド抗体、Fas若しくはFasリガンドの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、Fas若しくはFasリガンドのmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、Fasの細胞内領域と相互作用する物質またはICE阻害剤が挙げられる。

ここで、本発明で用いるFasアンタゴニストとしては、Fasを介する

- 10 アポトーシスを抑制する作用を有する、Fas誘導体、抗Fas抗体または抗Fasリガンド抗体が好ましい。

さらに、抗Fas抗体または抗Fasリガンド抗体はその治療対象由来のそれぞれ種のFasまたはFasリガンドを抗原とする抗体が好ましい。

例えば、ヒトの治療にはヒト由来のFasまたはFasリガンドを抗原とする抗

- 15 体すなわち抗ヒトFas抗体または抗ヒトFasリガンド抗体が好ましい。

また、抗Fasリガンド抗体はキメラ抗体またはヒト化抗体が好ましい。

キメラ抗体は、例えばヒトの治療にはヒト抗体からの定常領域及び非ヒト抗体からの可変領域からなるキメラ抗体が好ましい。ヒト化抗体は、例えばヒトの治療

には定常領域及びフレームワーク領域（FR）がヒト由来で、相補性決定領

- 20 域（CDR）が非ヒト由来であるのが好ましい。

さらに好ましくは、再構成（reshaped）したヒト型抗体（ヒト化抗体）を本発明に用いることができる。これはヒト以外の哺乳動物、たとえば



マウス抗体の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体の相補性決定領域へ置換したものである。非ヒト抗体は、ヒトの治療に用いる際には比較的循環半減期が短い、重要な免疫グロブリンの機能的特性を欠くまたは免疫原性を有する等の生物学的短所が生じることがある。さらに今後種々のマウス若しくは他の生物

5 のヒトに対する抗原性を有するモノクローナル抗体が開発されると、いずれかの異なった非ヒト抗体を用いた最初若しくは初期数回の処置の後、それに続く関連のない療法のための処置でさえ、交叉反応性のために効果がなかったり、若しくはそれ自身が危険な物質となることがあり得る。キメラ抗体またはヒト化抗体はこれらを克服する。

10 また、本発明で用いる Fas アンタゴニストは、国際特許出願公開公報 WO 95/13293 などに記載されている適当なアッセイ法において Fas 発現細胞のアポトーシスを抑制するものが好ましい。本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。

なお、本発明で用いられる抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナ

15 ル抗体であってもよく、また、本発明に使用される抗体の分子種は特に限定されない。抗原に結合し Fas を介するアポトーシスを阻害するかぎり、通常の形態の抗体分子であってもよいし、抗体の断片も使用することができる。例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv 又は H鎖と L鎖の Fv を一本鎖となるような適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv (scFv) も使用することが

20 できる。これらのうちでも特に平成 7 年 6 月 22 日付で日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号 P-15002）、さらに平成 8 年 5 月 9 日付で原寄託から国際寄託に移管した

(受託番号 F E R M B P - 5 5 3 5) ハイブリドーマ F 9 1 9 - 9 - 1 8 により  
り 産 生 さ れ る マ ウ ス F 9 1 9 - 9 - 1 8 抗 体 が 好 ま し い 例 で あ る 。

本 発 明 で 用 い る 抗 F a s リ ガ ン ド 抗 体 ま た は 抗 F a s 抗 体 は、公 知 技 術 を 利 用  
し て 作 製 す る こ と が 出 来 る。例 え ば 国 際 特 許 出 願 公 報 W O 9 5 / 1 3 2 9 3  
5 及 び 国 際 特 許 出 願 公 報 W O 9 5 / 0 2 2 9 0 等 に 作 成 方 法 が 記 載 さ れ て  
い る。本 明 細 書 は こ の 公 報 を 引 用 し、こ れ を も っ て 本 明 細 書 の 一 部 と す る。

本 発 明 で 用 い る 事 が で き る キ メ ラ 抗 体 は、既 知 の キ メ ラ 抗 体 の 製 造 方 法 を 用 い  
て 製 造 す る こ と が で き る。例 え ば 国 際 特 許 出 願 公 報 W O 9 5 / 1 3 2 9 3 の  
実 施 例 1 に キ メ ラ 蛋 白 質 の 作 成 方 法 が 記 載 さ れ て い る。本 明 細 書 は こ の 公 報 を 引  
10 用 し、こ れ を も っ て 本 明 細 書 の 一 部 と す る。

本 発 明 に 用 い る ヒ ト 化 抗 体 は、R i e c h m a n n L. 等、N a t u r e、  
3 3 2 巻、3 2 3 頁、1 9 8 8 年、ヨ ー ロ ッ パ 特 許 公 報 第 0 2 3 9 4 0 0  
号 公 報、Q u e e n 等、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A、8 6  
巻、1 0 0 2 9 号、1 9 8 9 年、国 際 特 許 出 願 公 報 W O 9 0 / 0 7 8 6 1、  
15 国 際 特 許 出 願 公 報 W O 9 2 / 1 1 0 1 8、C o 等、P r o c. N a t l.  
A c a d. S c i. U S A、8 8 巻、2 8 6 9 頁、1 9 9 1 年、C o 等、N a t  
u r e、3 5 1 巻、5 0 1 頁、1 9 9 1 年 及 び C o 等、J. I m m u n o l.、  
1 4 8 巻、1 1 4 9 頁、1 9 9 2 年 等 に 開 示 さ れ て い る 方 法 を 用 い て 製 造 す る こ

と が で き る。本 明 細 書 は こ の 文 献 を 引 用 し、こ れ を も っ て 本 明 細 書 の 一 部 と  
20 す る。本 発 明 の 好 適 な 例 と し て は、国 際 特 許 出 願 公 報 W O 9 7 / 0 2 2 9 0  
の 実 施 例 に 開 示 さ れ て い る マ ウ ス 抗 体 F 9 1 9 - 9 - 1 8 抗 体 の C D R を 有 す る  
ヒ ト 化 抗 F a s リ ガ ン ド 抗 体 が 挙 げ ら れ る。

本発明で使用されているF a s誘導体は、少なくともF a sリガンドとの結合能を有するかまたはF a sリガンドによるアポトーシスを抑制するものであれば、特に限定されない。公知のF a sアミノ酸配列中に1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加といった任意の変異を有し、F a sリガンドとの結合活性を維持したまま、F a s／F a sリガンド系の生物作用、特にF a sを介するアポトーシスを抑制するものが含まれる。具体的には、F a s変異体、切断型（truncated form）F a s、キメラタンパク質、融合タンパク質または化学的に修飾されたもの等が含まれる。なお、その由来となるF a sは上記の性質を有する限り、その動物種を問わないが、抗原性を考慮すればヒト由来のものを使用するのが好ましい。

より具体的には、公知のF a sの細胞外領域若しくは膜貫通領域を欠失したF a s、またはF a s細胞外領域と他のタンパク質とのキメラタンパク質、例えばヒトF a s細胞外領域とヒト免疫グロブリンのF c領域のキメラタンパク質であるヒトF a s－F c（hF a s－F c）等が挙げられる。F a s誘導体は、いずれの製法のものでも良く、公知の配列及び公知の遺伝子組換え技術等により製造することができる。例えば国際特許出願公開公報WO 95／13293の実施例1及び国際特許出願公開公報WO 97／42319の実施例中等に作成方法が記載されている。本明細書はこの公報を引用し、これをもって本明細書の一部とする。

また、F a sのN末端に欠失を有するF a s誘導体も好ましく、これらのうちでも特に平成8年3月14日付けで日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号P－15514及び受託番

号P-15515)、さらに平成9年3月6日付で原寄託から国際寄託に移管(受託番号FERMBP-5854及び受託番号FERMBP-5855)されている大腸菌が含むプラスミド(pM1304及びpM1317)にコードされているFas誘導体shFas(nd29)-FcおよびshFas  
5 (nd29)-hinge(国際特許出願公開公報WO97/42319)は、公知のヒトFasのN末端の1番目から29番目までのアミノ酸を欠失したFas細胞外領域を含有する誘導体であり、活性が高く、本発明の肝硬変の予防・治療剤の有効成分として好適な例である。本明細書はこの文献を引用し、これをもって本明細書の一部とする。

10 これらの本発明に用いるFas誘導体は、適当なアッセイ法によりFasリガンドに結合活性またはFasを介するアポトーシスの抑制活性を有することがわかる。

本発明で使用されるFasまたはFasリガンドの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはFas若しくはFasリガンドのmRNAに対  
15 するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、FasまたはFasリガンドの発現を抑制するものであれば、その配列は限定されない。その例として国際特許出願公開公報WO95/13293の実施例20に開示されているFasリガンドのアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。本明細書はこの公報を引用

し、これをもって本明細書の一部とする。

20 本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、肝硬変または胆管消失症候群患者に対して治療剤として使用することが可能である。また、肝疾患を有する患者に対して肝硬変または胆管消失症候群に対する予防剤として使用する

ことが可能である。

- 本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、F a s アンタゴニストを含有することを特徴とし、少なくとも一種の医薬用担体または媒体、例えば滅菌水、生理食塩水、植物油、鉱油、高級アルコール、高級脂肪酸または無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤または無痛化剤等と適宜組み合わせることで医薬組成物やキットの形態を取ることができ、経口的に、または静脈内、冠動脈内、皮下、筋肉内、経皮、吸入、直腸内若しくは局所等の非経口的に投与することができる。
- 10 好ましくは非経口的に、全身または局所的に、急速または持続的に投与することができる。

- ヒトに対する投与量は患者の病態、年齢または投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、全身投与の場合、約0.01～100mg/Kgの範囲で適当な分割容量を選択することが可能である。しかしながら、本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤の使用はこれらの投与方法または投与量に制限されるものではない。さらに、F a s - F a s リガンドの結合を抑制する物質、F a s 誘導体若しくは抗F a s リガンド抗体等の複数のF a s アンタゴニストを組み合わせることで使用しても、または他の薬剤と併用しても良い。
- 15

- 20 本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は常法に従って製剤化することができる。例えば注射用製剤は、精製されたF a s アンタゴニスト例えばF a s - F a s リガンドの結合を抑制する物質若しくは抗F a s リガンド抗体等

を生理食塩水若しくは緩衝液等の溶剤に溶解し、必要に応じて吸着防止剤等を加えて製剤化する。また、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥させたり、凍結乾燥のための一般的な賦形剤を加えたりして製剤化しても良い。

- 本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤に用いる Fas アンタゴニストは、肝硬変または胆管消失症候群モデル、特に実施例に記載するような原発性胆汁性肝硬変モデルにおいて、臓器及び組織の障害の抑制効果を示す。
- さらに、実施例では、マウスを用いたモデルで実験を行っているため、抗マウス Fas リガンド抗体を使用し臓器及び組織の障害の抑制効果を示しているが、ヒトに用いる場合は抗ヒト Fas リガンド抗体により実施例と同様の効果が期待できる。

- 胆管消失は、原発性胆汁性肝硬変及び原発性硬化性胆管炎のような胆汁性の肝の疾患のみではなく、その他の肝硬変においてもその前病変段階で報告されている。すなわち、遺伝的要因（小葉間胆管減少症）、感染（サイトメガロウイルス、レオウイルス、AIDS 及び肝炎ウイルス）、血管障害、化学物質（サルファ剤及び抗生物質等）または免疫学的機序（原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎及び移植に伴う肝疾患）等の様々な原因で起こる種々の慢性肝疾患において報告されている（肝胆膵、26 巻（3）、357-362、1993 年）。また、Yamada 等は、肝硬変は上述の慢性肝疾患の末期的な病態であると記載している（肝胆膵、26 巻（2）、181-186、1993 年）。すなわち、これらの報告及び記載から考察すると、今回実施例で用いたマウス原発性胆汁性肝硬変モデルに対して臓器及び組織の障害を抑制作用を示す Fas アンタゴニストが、発生原因の異なるすべての肝硬変を予防・治療可能

であることが示唆される。

なお、本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、実施例において示すとおり毒性がなく、安全に使用できる。すなわち、本発明の肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、肝硬変または胆管消失症候群に対して予防、

5 治療または改善作用が期待される。

以下に実施例をもって、本発明をいっそう具体的に説明するが、これらは実施の一例として示すものであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。また、以下の記載において用いる略号は当該分野において慣例として用いられる略号に基づくものである。

- 10 本発明の Fas アンタゴニストに含まれる Fas 誘導体である sh Fas (nd 29) - Fc 及び sh Fas (nd 29) - hinge の製法並びにアポトーシス抑制活性は国際特許出願公開公報 WO 97 / 42319 の実施例 2, 3, 5, 6 及び 8 に開示されている。また、本発明の Fas アンタゴニストに含まれる抗 Fas リガンド抗体の製法及びアポトーシス抑制活性は国際特許
- 15 出願公開公報 WO 97 / 02290 の実施例に開示されている。

実施例 1 sh Fas (nd 29) - Fc の毒性試験

(1) 試験方法

- 雄性、6 週令、BDF1 マウス（日本チャールス・リバー）に sh Fas (nd 29) - Fc を 10 及び 30 mg / kg の容量で 2 日に 1 回、12 日間、計 7
- 20 回尾静脈内から投与し、その影響を調べた。実験はコントロール群、sh Fas (nd 29) - Fc 10 mg / kg 投与群及び sh Fas (nd 29) - Fc 30 mg / kg 投与群の 3 群とし、各群 3 例とした。なお、各投与群の投

与タンパク質量を30mg/kgと等しくするために、コントロール群には30mg/kgのヒト血清アルブミンを、shFas(nd29)-Fc 10mg/kg群にはshFas(nd29)-Fc 10mg/kgとヒト血清アルブミン 20mg/kgを、shFas(nd29)-Fc 30mg/kg投与群にはshFas(nd29)-Fc 30mg/kgのみを投与した。

投与開始日から、2日に1回、体重測定を行った。投与開始日14日目に眼底静脈より採血を行い血球数を測定後、血漿を調製し、GOT、GPT及びクレアチニンを測定した。また、採血終了後、剖検を行い、目視により主要臓器（肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓及び腸）の変化を調べた。血球数の測定はSysmex社の自動血球測定装置K-2000（Sysmex）を用いて行った。GOT、GPT及びクレアチニンはオートアナライザーCOBAS FARA（ロッシュ）を用いて測定した。

## (2) 試験結果

10及び30mg/kgのshFas(nd29)-Fcを2日に1回、12日間、計7回マウスに投与しても体重増加、血球数、肝臓（GOT及びGPT）、腎臓（クレアチニン）並びにその他の主要臓器（肉眼的所見）への有意な影響は認められなかった。

## 実施例2 マウス原発性胆汁性肝硬変モデルにおけるshFas(nd29)-Fcの投与効果

### (1) マウス原発性胆汁性肝硬変モデルの作製

マウス原発性胆汁性肝硬変モデルの作製は、Howellらの方法（J. Im



mnunology、143巻、476-483、1989年)に従って行った。すなわち、雌性、4週齢、B a l b / c マウス(日本S L C)に半致死量である600radの放射線を照射した(day 0)。放射線照射の4~6時間後、放射線照射したB a l b / c マウスに $3 \times 10^7$ 個のB 1 0 D 2 マウス由来脾臓リンパ球を尾静脈から移植した。移植21日目に肝臓を摘出し、4%パラフォルムアルデヒドにて固定後、組織切片を作製した。組織切片をヘマトキシリン-エオジン染色し顕微鏡下で観察して、胆管における炎症(細胞浸潤、組織障害)の有無の確認及び病理学的評価を行った。

また、放射線照射したB a l b / c マウスに移植したB 1 0 D 2 マウス由来脾臓リンパ球は以下のように調整した。B 1 0 D 2 マウス(日本S L C)の脾臓をハンクス液(日水製薬)中でピンセットを用いてほぐした後、遠心して細胞を得、0.017Mトリス-0.747%塩化アンモニウム溶液中に懸濁し、不要な赤血球を溶血させた。得られた細胞をさらにハンクス液で洗浄して、B 1 0 D 2 マウス由来脾臓リンパ球とした。

#### 15 (2) s h F a s (n d 2 9) - F c の投与

s h F a s (n d 2 9) - F c 群には、B 1 0 D 2 マウス由来脾臓リンパ球移植の直前(day 0)、1日後(day 1)及び7日後(day 7)の計3回、尾静脈から20 $\mu$ g/0.2ml/マウスの用量で投与した(n=4)。コントロール群には生理食塩水を0.2ml/マウスの用量で尾静脈から投与した

20 (n=5)。

#### (3) 病理学的評価

表1に示したJ. V i e l i n g の胆管炎基準をもとにスコア化し、評価

した。

表 1

グレード	門脈の炎症	胆管の障害
0	30%未満	正常
1	30～40%未満	胆管周囲の炎症
2	40～60%未満	胆管周囲の炎症と異常細胞の出現
3	60～80%未満	胆管の炎症
4	80%以上	胆管構造の乱れもしくは破壊

#### (4) 結果

結果を表2に示した。

表2 shFas (nd29) -Fc の胆管炎に対する投与効果 (day 21)

群	胆管に炎症の認められた 個体の割合 (%)	平均病理学的 スコア
コントロール	100 (5例中5例)	1.6
shFas (nd29) -Fc	25 (4例中1例)	0.25

コントロール群は5例中5例に胆管の炎症が認められたのに対し、shFas

(nd29) -Fc 投与群は胆管の炎症が認められたのは4例中1例であった。

また、平均病理スコアにおいても、shFas (nd29) -Fc 投与群のスコアはコントロール群よりも低かった。

実施例3 抗マウスFasリガンド抗体の作製、生産及び精製

(1) 抗マウス Fas リガンド抗体の作製

遺伝子工学的手法を用いたマウス Fas リガンド WX2 (J. Immunology, 157 巻、3918-3924 頁、1996 年) 由来のマウス Fas リガンド細胞外領域とマウス CD40 リガンドの細胞内領域、膜貫通領域および細胞外領域の一部 (N 末端から 78 アミノ酸) を融合したキメラ蛋白質をコードする遺伝子をヒトエロンゲーションファクター (EF) プロモータ (ミズシマーナガタ (Mizushima-Nagata), Nucleic Acids Research, 18 巻、5322 頁、1990 年) の下流に有するプラスミドを作製した。上記プラスミドを WR19L 細胞にトランスフェクトし、細胞膜上にマウス Fas リガンドを発現している組換え細胞 W40LFL を得て、投与抗原として用いた。免疫動物としてアルメニアハムスターを用いた。フロイント完全アジュバントと混合した  $1 \times 10^7$  個の W40LFL をアルメニアハムスターの皮下に投与し、1 ヶ月後に PBS に懸濁した  $2 \times 10^7$  個の W40LFL を皮下に投与した。さらに 1 ヶ月後、PBS に懸濁した  $5 \times 10^6$  個の W40LFL をフットパッドに投与した。3 日後、リンパ節細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-U1 (P3-U1) と細胞融合した。HAT 培地 (ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン) による選択の後、生育したハイブリドーマの中から、その培養上清中にマウス Fas リガンドによる細胞障害性を中和する活性を有するハイブリドーマ FLIM58 を得た。

(2) FLIM58 の生産および精製

ハイブリドーマ FLIM58 を無血清培地 Hybridoma-SFM (GIBCO BRL) にて培養し、その培養上清をプロテイン-A カラム (PROS

EP-A、Bioprocessing)で精製し、精製抗体FLIM58を得た。蛋白濃度は280nmの吸光度より算出した。

#### 実施例4 抗マウスFasリガンド抗体FLIM58の毒性試験

##### (1) 方法

- 5 雄性、8週齢、DBA/1JマウスおよびC3H/Heマウス(日本チャールス・リバー)を用いた。抗マウスFasリガンド抗体FLIM58を100mg/30ml/kgの用量で尾静脈から投与した。またコントロール群には生理食塩水を30ml/kgの用量で尾静脈から投与した。2種の系統ともに各群3例とした。観察期間を7日間とし、体重測定、血液学的検査(赤
- 10 血球、白血球、血小板)、血液生化学的検査(GOT、GPT、尿素窒素)、肉眼による剖検を行った。

##### (2) 結果

- 抗マウスFasリガンド抗体FLIM58投与群の投与後の体重増加、血液学的検査値(赤血球、白血球、血小板)、血液生化学的検査値(GOT、GPT、
- 15 尿素窒素)はコントロール群と比べて差を認めなかった。また、肉眼による剖検所見においても抗マウスFasリガンド抗体FLIM58投与群に異常は認められなかった。

#### 実施例5 マウス原発性胆汁性肝硬変モデルにおける抗マウスFasリガンド抗

##### 体FLIM58の投与効果

- 20 (1) マウス原発性胆汁性肝硬変モデルの作製

実施例2と同様の方法にて作製した。

##### (2) FLIM58の投与

FLIM58投与群には、B10D2マウス由来脾臓リンパ球移植の直前(day 0)、1日後(day 1)及び7日後(day 7)の計3回、尾静脈から $20\mu\text{g}/0.2\text{ml}$ /マウスの用量で投与した( $n=5$ )。コントロール群には生理食塩水を $0.2\text{ml}$ /マウスの用量で尾静脈から投与した( $n=5$ )。

### 5 (3) 病理学的評価

実施例2と同様の方法にて評価した。

### (4) 結果

結果を表3に示した。

表3 FLIM58の胆管炎に対する投与効果(day 21)

10

群	胆管に炎症の認められた個体の割合(%)	病理学的スコア
コントロール	100 (5例中5例)	1.6
FLIM58	40 (5例中2例)	0.6

コントロール群は5例中5例に胆管の炎症が認められたのに対し、FLIM58投与群は胆管の炎症が認められたのは5例中2例であった。また、平均病理スコアにおいても、FLIM58投与群のスコアはコントロール群よりも低かった。

### 産業上の利用可能性

20 本発明のFasアンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤は、Fasを介するアポトーシスの抑制作用により、特にFasを介した細胞の死に代表されるFas/Fasリガンド系の生物作用等の

アポトーシスが関与する肝硬変または胆管消失症候群の予防または治療効果を有する。従って、本発明のF a s アンタゴニストは、F a s を介した細胞の死等、F a s を介するアポトーシスが関与する肝硬変または胆管消失症候群の疾患の予防・治療剤として期待される。

## 請 求 の 範 囲

1. Fas アンタゴニストを有効成分とする肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療剤。
2. 前記 Fas アンタゴニストが Fas-Fas リガンドの結合を抑制する物質である請求項 1 に記載の予防・治療剤。
3. 前記 Fas アンタゴニストが Fas 誘導体である請求項 1 または 2 に記載の予防・治療剤。
4. 前記 Fas アンタゴニストが抗 Fas リガンド抗体である請求項 1 または 2 に記載の予防・治療剤。
5. 前記肝硬変が胆汁性肝硬変である請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の予防・治療剤。
6. 前記肝硬変が原発性胆汁性肝硬変である請求項 5 に記載の予防・治療剤。
7. 前記胆管消失症候群が免疫学的機序による胆管消失症候群である請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の予防・治療剤。
8. Fas アンタゴニストを投与する肝硬変または胆管消失症候群の予防・治療方法。
9. 肝硬変または胆管消失症候群の予防および／または治療のための医薬品を製造するための Fas アンタゴニストの使用。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/02477

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K45/00, A61K39/395, A61K38/02, A61K31/70, C07K16/18, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K45/00, A61K39/395, A61K38/02, A61K31/70, C07K16/18, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), CAPLUS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HARADA, K. et al., "Enhanced Apoptosis Relates to Bile Duct Loss in Primary Biliary Cirrhosis" Hepatology, 1997, Vol. 26, No. 6, p.1399-1405	1-7, 9
Y	SEISHIMA, M., et al., "Increased serum soluble Fas (sFas) concentrations in HCV-positive patients with liver cirrhosis" Journal of Hepatology, 1997, Vol. 27, p.424-427	1-7, 9
Y	GALLE, P.R., et al., "Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage" J. Exp. Med., 1995, Vol. 182, p.1223-1230	1-7, 9
Y	JP, 9-72901, A (Nippon DPC Corp.), 18 March, 1997 (18. 03. 97), Refer to Claims ; Par. Nos. [0002], [0006], [0010] ; Tables 1, 2 (Family: none)	1-4, 9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 3 August, 1999 (03. 08. 99)	Date of mailing of the international search report 17 August, 1999 (17. 08. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 95/13293, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 18 May, 1995 (18. 05. 95), Refer to Examples 16, 17, 19, 20 ; Figs. 30, 32, 37, 38 & EP, 675200, A1 & AU, 9481158, A & JP, 7-513719, A	1, 2, 4-7, 9
Y	WO, 97/02290, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 23 January, 1997 (23. 01. 97), Refer to Examples 3, 9 to 11 ; Tables 4 to 7 ; Figs. 16, 17 & EP, 842948, A1 & AU, 9662435, A & JP, 9-504989, A	1, 2, 4-7, 9
Y	WO, 97/42319, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 13 November, 1997 (13. 11. 97), Refer to Examples 3 to 11 ; page 60, "Industrial Applicability" ; Figs. 9 to 12 & AU, 9726505, A	1-3, 5-7, 9
Y	JP, 9-124509, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 13 May, 1997 (13. 05. 97), Refer to Example 1 & EP, 862919, A1 & WO, 97/15326, A1	1, 2, 4-7, 9
Y	ROUQUET, N., et al., "ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against <i>in vivo</i> liver apoptosis" Current Biology, 1996, Vol. 6, No. 9, p.1192-1195, Refer to the full text	1, 2, 5-7, 9

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/02477

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.<sup>6</sup> A61K45/00, A61K39/395, A61K38/02, A61K31/70,  
C07K16/18, C12N15/09

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.<sup>6</sup> A61K45/00, A61K39/395, A61K38/02, A61K31/70,  
C07K16/18, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HARADA, K. et al., 'Enhanced Apoptosis Relates to Bile Duct Loss in Primary Biliary Cirrhosis' Hepatology, 1997, Vol. 26, No. 6, p. 1399-1405	1-7, 9
Y	SEISHIMA, M., et al., 'Increased serum soluble Fas (sFas) concentrations in HCV-positive patients with liver cirrhosis' Journal of Hepatology, 1997, Vol. 27, p. 424-427,	1-7, 9
Y	GALLE, P.R., et al., 'Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage' J. Exp. Med., 1995, Vol. 182, p. 1223-1230	1-7, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.99

国際調査報告の発送日

17.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治

4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

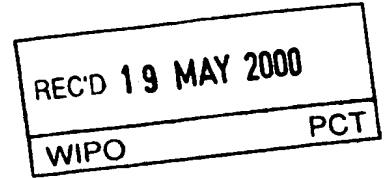
ST

特 許 協 力 条 約

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 PCT98	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/02477	国際出願日 (日.月.年) 13.05.99	優先日 (日.月.年) 14.05.98
国際特許分類(IPC) Int. cl <sup>7</sup> A61K45/00, A61K39/395, A61K38/02, A61K31/70, C07K16/18, C12N15/09, A61P1/16		
出願人(氏名又は名称)  持田製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 05.11.99	国際予備審査報告を作成した日 27.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  新留 豊 	4C 9639
電話番号 03-3581-1101 内線 3452		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



## Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 8

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 8 は、治療による人体の処置方法に該当し、PCT 34 条（4）（a）（i）及び PCT 規則 67.1（iv）の規定により、この国際予備審査機関が国際予備審査を行うことを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 8 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書 C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査を行うことができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-7, 9	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-7, 9	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-7, 9	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: HARADA, K. et al., 'Enhanced Apoptosis Relates to Bile Duct Loss in Primary Biliary Cirrhosis' Hepatology, 1997, Vol.26, No.6, p.1399-1405

文献2: SEISHIMA, M., et al., 'Increased serum soluble Fas (sFas) concentrations in HCV-positive patients with liver cirrhosis' Journal of Hepatology, 1997, Vol.27, p.424-427

文献3: GALLE, P.R., et al., 'Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage' J.Exp.Med., 1995, Vol.182, p.1223-1230

文献4: J P, 9-72901, A (ニッポン・ディービーシー・コーポレーション), 18. 3月. 1997 (18. 03. 97)

文献5: WO, 95/13293, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 18. 5月. 1995 (18. 05. 95)

文献6: WO, 97/02290, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 23. 1月. 1997 (23. 01. 97)

文献7: WO, 97/42319, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 13. 11月. 1997 (13. 11. 97)

文献8: J P, 9-124509, A (住友電気工業株式会社), 13. 5月. 1997 (13. 05. 97)

文献9: ROUQUET, N., et al., 'ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against *in vivo* liver apoptosis' Current Biology, 1996, Vol.6, No.9, p.1192-1195

説明: 文献1-4には、CD95/CD95リガンド(Fas-Fasリガンド)相互作用(すなわちFasとFasリガンドの結合)によるアポトーシスが、肝硬変あるいは原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis)における胆管消失における

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VIII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

明細書の記載を参酌すれば、請求の範囲 2 に記載の「F a s アンタゴニスト(Fas antagonist)」には、抗 F a s 抗体も含まれると解されるが、抗 F a s 抗体は場合によりアポトーシスを促進することが知られているため、所望の治療効果が必ずしも得られないと認められる。

この点について、本願明細書は抗 F a s 抗体の治療効果について、十分な裏付けを示していないと判断される。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

## 第 V 欄の続き

肝細胞の破壊に寄与しており、この相互作用を抑制することにより、治療しうることが記載されている。

一方で文献5-9には、F a s アンタゴニストである、F a s リガンド遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド(antisense oligonucleotide)、抗F a s リガンド抗体、F a s 誘導体あるいはI C E 阻害剤が、F a s とF a s リガンドの結合を抑制し、アポトーシスを防ぐことが記載されている。

したがって、文献5-9に記載のF a s とF a s リガンド結合を抑制するF a s アンタゴニストを用いて、肝硬変あるいは原発性胆汁性肝硬変における胆管消失の予防、治療剤を製造することは、当業者に自明の事項である。

よって、請求の範囲1-7及び9に係る発明は、進歩性を有さない。

請求の範囲1-7及び9に係る発明は、産業上の利用可能性を有する。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PCT98	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/02477	国際出願日 (日.月.年) 13.05.99	優先日 (日.月.年) 14.05.98
出願人(氏名又は名称) 持田製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.<sup>8</sup> A61K45/00, A61K39/395, A61K38/02, A61K31/70,  
C07K16/18, C12N15/09

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.<sup>8</sup> A61K45/00, A61K39/395, A61K38/02, A61K31/70,  
C07K16/18, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HARADA, K. et al., 'Enhanced Apoptosis Relates to Bile Duct Loss in Primary Biliary Cirrhosis' Hepatology, 1997, Vol. 26, No. 6, p. 1399-1405	1-7, 9
Y	SEISHIMA, M., et al., 'Increased serum soluble Fas (sFas) concentrations in HCV-positive patients with liver cirrhosis' Journal of Hepatology, 1997, Vol. 27, p. 424-427,	1-7, 9
Y	GALLE, P.R., et al., 'Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage' J. Exp. Med., 1995, Vol. 182, p. 1223-1230	1-7, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.99

国際調査報告の発送日

17.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治



4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 9-72901, A (ニッポン・ディービーシー・コーポレーション), 18. 3月. 1997 (18. 03. 97), 請求の範囲, 段落【0002】、【0006】、【0010】及び表1, 2参照 ファミリーなし	1-4, 9
Y	WO, 95/13293, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 18. 5月. 1995 (18. 05. 95), 実施例16, 17, 19, 20及び図30, 32, 37, 38参照 & EP, 675200, A1 & AU, 9481158, A & JP, 7-513719, A	1, 2, 4-7, 9
Y	WO, 97/02290, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 23. 1月. 1997 (23. 01. 97), 実施例3, 9-11, 表4-7並びに図16及び17参照 & EP, 842948, A1 & AU, 9662435, A & JP, 9-504989, A	1, 2, 4-7, 9
Y	WO, 97/42319, A1 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 13. 11月. 1997 (13. 11. 97), 実施例3-11, 第60頁「産業上の利用の可能性」、及び図9-12参照 & AU, 9726505, A	1-3, 5-7, 9
Y	JP, 9-124509, A (住友電気工業株式会社), 13. 5月. 1997 (13. 05. 97), 実施例1参照 & EP, 862919, A1 & WO, 97/15326, A1	1, 2, 4-7, 9
Y	ROUQUET, N.; et al., 'ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against <i>in vivo</i> liver apoptosis' Current Biology, 1996, Vol.6, No.9, p.1192-1195, 全文参照	1, 2, 5-7, 9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



4T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT98	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/02477	International filing date (day/month/year) 13 May 1999 (13.05.99)	Priority date (day/month/year) 14 May 1998 (14.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45/00, 39/395, 38/02, 31/70, C07K 16/18, C12N 15/09, A61P 1/16		
Applicant MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 05 November 1999 (05.11.99)	Date of completion of this report 27 April 2000 (27.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 8

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of claim 8 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international preliminary examination by this International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(iv).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 8

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7,9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-7,9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7,9	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: Enhanced Apoptosis Relates to Bile Duct Loss in Primary Biliary Cirrhosis, (HARADA, K. et al.), Hepatology, 1997, Vol. 26, No. 6, pages 1399-1405  
 Document 2: Increased serum soluble Fas (sFas) concentrations in HCV-positive patients with liver cirrhosis, (SEISHIMA, M. et al.), Journal of Hepatology, 1997, Vol. 27, pages 424-427  
 Document 3: Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage, (GALLE, P.R. et al.), J. Exp. Med., 1995, Vol. 182, pages 1223-1230  
 Document 4: JP, 9-72901, A (Nippon DPC Corp.), 18 March, 1997 (18.03.97)  
 Document 5: WO, 95/13293, A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 May, 1995 (18.05.95)  
 Document 6: WO, 97/02290, A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 January, 1997 (23.01.97)  
 Document 7: WO, 97/42319, A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 13 November, 1997 (13.11.97)  
 Document 8: JP, 9-124509, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 13 May, 1997 (13.05.97)  
 Document 9: ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against *in vivo* liver apoptosis, (ROUQUET, N. et al.), Current Biology, 1996, Vol. 6, No. 9, pages 1192-1195

#### Explanation:

Documents 1-4 disclose the fact that apoptosis caused by CD95/CD95 ligand (Fas-Fas ligand) interaction (i.e. the binding of Fas ligands to one another) contributes to the destruction of hepatic cells that occurs in the bile duct disappearance that occurs in cirrhosis or primary biliary cirrhosis, and that it is possible to treat such diseases by suppressing said interaction.

Documents 5-9, on the other hand, disclose the fact that antisense oligonucleotides against Fas ligand genes, anti-Fas ligand antibodies, Fas derivatives and ICE inhibitors, which are all Fas antagonists, suppress Fas-Fas ligand binding, thus preventing apoptosis.

It is thus considered that using the Fas antagonists disclosed in documents 5-9 that suppress Fas-Fas ligand binding in order to manufacture preventatives/remedies for bile duct disappearance that occurs in cirrhosis or primary biliary cirrhosis would be obvious to a person skilled in the art.

The subject matter of claims 1-7 and 9 is thus considered not to involve an inventive step.

The subject matter of claims 1-7 and 9 is considered to have industrial applicability.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

It is inferred from the disclosures in the description that the 'Fas antagonists' disclosed in claim 2 include anti-Fas antibodies. However, it is known that in some cases anti-Fas antibodies may actually promote apoptosis, and so it is considered that the desired therapeutic effects may not necessarily be obtained.

With regard to this point, it is considered that there is insufficient substantiation in the description concerning the therapeutic effects of anti-Fas antibodies.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

4T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT98	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/02477	International filing date (day/month/year) 13 May 1999 (13.05.99)	Priority date (day/month/year) 14 May 1998 (14.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45/00, 39/395, 38/02, 31/70, C07K 16/18, C12N 15/09, A61P 1/16		
Applicant MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 05 November 1999 (05.11.99)	Date of completion of this report 27 April 2000 (27.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 8

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of claim 8 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international preliminary examination by this International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(iv).

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 8

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-7,9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-7,9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7,9	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: Enhanced Apoptosis Relates to Bile Duct Loss in Primary Biliary Cirrhosis, (HARADA, K. et al.), Hepatology, 1997, Vol. 26, No. 6, pages 1399-1405

Document 2: Increased serum soluble Fas (sFas) concentrations in HCV-positive patients with liver cirrhosis, (SEISHIMA, M. et al.), Journal of Hepatology, 1997, Vol. 27, pages 424-427

Document 3: Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage, (GALLE, P.R. et al.), J. Exp. Med., 1995, Vol. 182, pages 1223-1230

Document 4: JP, 9-72901, A (Nippon DPC Corp.), 18 March, 1997 (18.03.97)

Document 5: WO, 95/13293, A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 May, 1995 (18.05.95)

Document 6: WO, 97/02290, A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 January, 1997 (23.01.97)

Document 7: WO, 97/42319, A1 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 13 November, 1997 (13.11.97)

Document 8: JP, 9-124509, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 13 May, 1997 (13.05.97)

Document 9: ICE inhibitor YVADcmk is a potent therapeutic agent against *in vivo* liver apoptosis, (ROUQUET, N. et al.), Current Biology, 1996, Vol. 6, No. 9, pages 1192-1195

**Explanation:**

Documents 1-4 disclose the fact that apoptosis caused by CD95/CD95 ligand (Fas-Fas ligand) interaction (i.e. the binding of Fas ligands to one another) contributes to the destruction of hepatic cells that occurs in the bile duct disappearance that occurs in cirrhosis or primary biliary cirrhosis, and that it is possible to treat such diseases by suppressing said interaction.

Documents 5-9, on the other hand, disclose the fact that antisense oligonucleotides against Fas ligand genes, anti-Fas ligand antibodies, Fas derivatives and ICE inhibitors, which are all Fas antagonists, suppress Fas-Fas ligand binding, thus preventing apoptosis.

It is thus considered that using the Fas antagonists disclosed in documents 5-9 that suppress Fas-Fas ligand binding in order to manufacture preventatives/remedies for bile duct disappearance that occurs in cirrhosis or primary biliary cirrhosis would be obvious to a person skilled in the art.

The subject matter of claims 1-7 and 9 is thus considered not to involve an inventive step.

The subject matter of claims 1-7 and 9 is considered to have industrial applicability.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02477

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

It is inferred from the disclosures in the description that the 'Fas antagonists' disclosed in claim 2 include anti-Fas antibodies. However, it is known that in some cases anti-Fas antibodies may actually promote apoptosis, and so it is considered that the desired therapeutic effects may not necessarily be obtained.

With regard to this point, it is considered that there is insufficient substantiation in the description concerning the therapeutic effects of anti-Fas antibodies.

7. (USPTO)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**